

**TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR ORALEN IMMUNISIERUNG
GEGEN PERTUSSIS**

Veronika Laßleben

1976

Aus der Bayerischen Landesimpfanstalt

Vorstand: Prof. Dr. H. Stickl

vorgelegt

vom

Institut für Medizinische Mikrobiologie,

Infektions- und Seuchenmedizin

des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR ORALEN

IMMUNISIERUNG GEGEN PERTUSSIS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-

Universität München

von

Veronika Laßleben

aus

Kallmünz

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Tiermedizin der Universität
München



Dekan: Prof.Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof.Dr. Dr. h.c.A. Mayr

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 27. Februar 1976

	Seite
3. <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	16
3.1. <u>Material und Methoden</u>	16
3.1.1. Tiermaterial, Haltungs- und Versuchs- bedingungen	16
3.1.1.1. Mäuse	16
3.1.1.2. Meerschweinchen	17
3.1.2. Impfstoff	17
3.1.3. Immunisierung	18
3.1.3.1. Mäuseimmunisierung	18
3.1.3.2. Meerschweinchenimmunisierung	20
3.1.4. Bakterienmaterial	21
3.1.5. Nährboden	21
3.1.6. Anzüchtung der Bakterien	22
3.1.6.1. Lyophilisiertes Material	22
3.1.6.2. Gehirnmateriel	22
3.1.7. Virulenzerhaltung der Bakterien	22
3.1.8. Konservierung der Bakterien	23
3.1.9. Diagnostizierung und Differenzierung von Bordetella pertussis	24
3.1.9.1. Makroskopische Beurteilung des Kolo- nienwachstums	24
3.1.9.2. Mikroskopische Untersuchung der Bak- terien	24
3.1.10. Keimzahlbestimmung	25
3.1.11. Belastungsversuche	26
3.1.12. Auswertung der Belastungsversuche	30

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

1. EINLEITUNG 1
2. SCHRIFTTUM ÜBER DIE AKTIVE IMMUNISIERUNG 2

GEGEN KEUCHHUSTEN

- 2.1. Entwicklung und Grundlagen der Keuch- 2
hustenschutzimpfung
- 2.2. Impfstoffe gegen Keuchhusten 3
- 2.2.1. Allgemeines über Keuchhustenimpfstoffe 3
- 2.2.2. Impfstofftypen 4
- 2.2.2.1. Einfachimpfstoffe 4
- 2.2.2.2. Kombinationsimpfstoffe 6
- 2.2.3. Wertbemessung von Pertussisimpfstoffen 7
- 2.3. Bisher geübte Impfverfahren 8
- 2.3.1. Subkutane oder intramuskuläre Immuni- 8
sierung
- 2.3.1.1. prophylaktische Vakzination 8
- 2.3.1.2. therapeutische Vakzination 8
- 2.3.2. Lokale Immunisierung 9
- 2.3.2.1. Intranasale Immunisierung 9
- 2.3.2.2. Inhalations-Immunisierung 9
- 2.4. Impfkomplicationen 10

	Seite
3.1.13. Serumgewinnung	30
3.1.14. Antikörperbestimmung	30
3.1.14.1. Bestimmung des Agglutinationstiters	30
3.1.14.2. Ak-Bestimmung nach einer modifizierten Mancinitechnik	31
3.2. <u>Ergebnisse</u>	32
3.2.1. <u>Vorversuche</u>	32
3.2.1.1. Ak-Bestimmung nach oraler Immunisierung von Meerschweinchen	32
3.2.1.2. Ergebnis von Belastungsversuchen nach oraler Immunisierung von Mäusen mit der handelsüblichen Pertussis-Vakzine	34
3.2.2. <u>Hauptversuche</u>	35
3.2.2.1. Ergebnis der Belastungsversuche an Mäusen nach unterschiedlichen Applikationsarten bei der enteralen Immunisierung	35
3.2.2.2. Ergebnis der Belastungsversuche an Mäusen nach einer Booster-Immunisierung	39
3.2.2.3. Ergebnis der Belastungsversuche an Mäusen mit unterschiedlichen Impfrhythmen	42
3.2.2.4. Ergebnis der Belastungsversuche an Mäusen nach Applikation verschiedener Ag-Dosen	45

3.2.2.5.	Verträglichkeitsprüfung der enteral verabreichten Pertussis-Bakterien	48
3.2.2.6.	Ergebnisse der Antikörperbestimmung bei den Mäuseversuchen	48
4.	<u>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</u>	50
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	56
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	59

1. E I N L E I T U N G

Die Keuchhustenerkrankung verursacht trotz der modernen Therapiemöglichkeiten bei Kindern mehr Todesfälle als jede andere ansteckende Krankheit. 70 - 90 % ihrer Opfer sind Säuglinge im ersten Lebenshalbjahr, welche durch die zur Zeit praktizierte Pertussis-Impfung nicht erfaßt werden.

Doch auch die Keuchhustenschutzimpfung selbst ist häufig von unangenehmen Reaktionen begleitet, die manchmal sogar letalen Ausgang nehmen.

Dabei wird zur Zeit diskutiert, ob sich durch eine orale Verabreichung von Pertussisantigenen Impfkomplicationen vermeiden bzw. senken lassen. Zum anderen könnte eine Schluckimpfung bereits Säuglinge aktiv gegen Pertussis immunisieren helfen.

Aufgabe vorliegender Arbeit ist es, am Modell Maus zu untersuchen, ob eine orale Schutzimpfung gegen Pertussis grundsätzlich möglich ist und welche technischen Bedingungen (Menge des Antigens, Verabreichungsform u.s.w.) hierzu Voraussetzung sind.

2. S C H R I F T T U M

ÜBER DIE AKTIVE IMMUNISIERUNG GEGEN KEUCHHUSTEN

2.1. Entwicklung und Grundlagen der Keuchhusten- schutzimpfung

BORDET und GENGOU (37) konnten 1900 anlässlich einer Keuchhustenepidemie den Erreger des Keuchhustens, *Bordetella pertussis*, erstmals mikroskopisch nachweisen; 1909 gelang ihnen seine Anzüchtung auf Kartoffel-Glycerin-Blutagar-Nährboden.

Nachdem LESLIE und GARDENER (53) 1931 vier Phasen des Keuchhustenerregers unterschieden und erkannten, daß *Bordetella pertussis* nur in Phase I voll virulent ist, war die Voraussetzung für die Entwicklung eines Keuchhustenimpfstoffes geschaffen.

MADSEN (56) erprobte 1933 erstmals einen von Kranken frisch angezüchteten Impfstoff; SAUER (76) entwickelte diesen weiter, indem er die Keimzahl pro Impfling auf $70 - 80 \times 10^9$ festsetzte und die Vaccine auch rein prophylaktisch verabreichte. Seine Versuche und die Feldversuche von KENDRICK und ELDERING (46), bereits mit einem Mischimpfstoff aus *Pertussis*bakterien und Diphtherietoxoid, zeigten die immunisierende Wirkung des Impfstoffes gegen

eine Infektion mit Pertussis. Sie konnten eine Abnahme der Erkrankungszahl und einen milderen Krankheitsverlauf der Geimpften gegenüber ungeimpften Kontrollen feststellen.

Die Auswertung des Keuchhustenimpfstoffes im Tierversuch durch KENDRICK (47) führte zu einer Standardisierung der Pertussisimpfstoffe und stellte die wesentliche Grundlage für eine sinnvolle Schutzimpfung gegen Keuchhusten dar.

2.2. Impfstoffe gegen Keuchhusten

2.2.1. Allgemeines über Keuchhustenimpfstoffe:

Für die Herstellung der Keuchhustenimpfstoffe eignen sich nur Bakterien der Phase I nach LESLIE und GARDENER (53), welche 1931 vier Phasen von *Bordetella pertussis* unterschieden: Phase I entspricht den von Kranken frisch isolierten Stämmen, nur sie sind voll antigen und virulent und für die Vakzineherstellung geeignet; Phase IV ist den alten Laborstämmen eigen, die Phasen II und III sind als Übergangsformen zu sehen.

Nach den Forderungen der World Health Organization (WHO) sollte jeder Impfstoff aus mindestens 3 - 4 voll wirksamen Pertussis-Stämmen bestehen (88), da sich die einzelnen Stämme serologisch in mehrere

Typen unterscheiden lassen (57,58).

Durch Lyophilisierung (52) läßt sich der Pertussisimpfstoff ca 8 Jahre (38) bei +4 bis +10 °C konservieren.

2.2.2. Impfstofftypen:

1. Einfachimpfstoffe

aus Vollbakterien:

- a) Fluidimpfstoff: Er besteht aus einer Aufschwemmung abgetöteter Pertussisbakterien in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl). Wegen ihrer heftigen Reaktionen an der Impfstelle, die auch häufig mit einer starken Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens verbunden sind (90), eignen sich Impfstoffe aus lebenden Pertussisbakterien nicht für die Prophylaxe.

Für die Inaktivierung und Konservierung wird Merthiolat 1 : 10000 empfohlen (38).

- b) Adsorbatimpfstoff: Mineralische Adjuvantien wie Aluminiumphosphat, Aluminiumhydroxyd und Aluminiumoxyd steigern die immunisierende Wirkung eines Pertussisimpfstoffes um das 2 - 3 fache (38). Bei diesen Adsorbatimpfstoffen läßt sich deshalb die Menge des Antigens herabsetzen; Außerdem verstärken sie die vor allem bei jun-

gen Säuglingen etwas langsame Immunantwort.
Der Nachteil besteht in stärkeren entzündlichen Reaktionen an der Impfstelle.

aus aufgeschlossenen Bakterienzellen:

Es wurden etliche Versuche unternommen, durch verschiedene Verfahren das schützende Antigen (Ag) darzustellen und für ein neues Vakzinierungsverfahren einzusetzen.

ELDERING (20) isolierte ein kohlehydrathaltiges Antigen, welches Mäuse gegenüber einer nachfolgenden Infektion schützte.

PILLEMER et al. (66,67) stellten mit Hilfe der Ultrabeschallung und anschließender Adsorption an Stromata menschlicher Erythrocyten ein Ag her, das S.P.A. (stroma protective antigen), das beim Menschen in der Impfprophylaxe bereits mit Erfolg eingesetzt wurde (2,18,22). Es wurde jedoch meist schlecht vertragen.

FINGER et al. (27) konnten durch ein besonderes Verfahren eine Keimsuspension von Bordetella pertussis in 11 Fraktionen auftrennen; dabei fanden sie, daß die Fraktionen I,II,VI,VII und VIII vor allem schützend wirkten.

Diese Entwicklung, aus aufgeschlossenen Bakterienzellen einen Impfstoff herzustellen, liegt

noch im Versuchsstadium; bisher werden für die Vakzineherstellung nur Vollantigene verwendet.

2. Kombinationsimpfstoffe

Durch die Einführung von Kombinationsimpfstoffen in der Impfprophylaxe ließen sich die Zahl der nötigen Injektionen stark verringern.

DPT-Impfstoff: Hierbei handelt es sich um einen Kombinationsimpfstoff aus den Toxoiden der Diphtherie- und Tetanus Erreger mit inaktivierten Pertussisbakterien.

Bordetella (B.) pertussis verhält sich gegenüber dem Tetanus-Toxoid als Adjuvans (39). FLEMING und GREENBERG (28) fanden eine 20 fach höhere Immunität bei der Anwendung des Mischimpfstoffes als bei der Injektion von Tetanus-Toxoid allein. Der Adjuvanseffekt der Pertussiskomponenten beruht nach Untersuchungen von FINGER (23,24,25,26) auf einer Stimulierung des lymphatischen Gewebes der Milz.

Überstarke Reaktionen nach der Injektion sind auf die Pertussiskomponente zurückzuführen (65).

Durch eine Senkung der Keimkonzentration, z.B. von 20 auf 10 Milliarden / ml (89) lassen sich diese Reaktionen mildern, ohne die Pertussisimmunität wesentlich abzuschwächen.

DTPPol.-Impfstoff: Dieser Impfstoff setzt sich aus einem polyvalenten (bestehend aus 3 Serotypen) Polio-Impfstoff und dem oben genannten DPT-Kombinationsimpfstoff zusammen. Nach BORDT (9) wird durch diese Kombination die Immunität gegen Tetanus und Pertussis nicht beeinflusst; die Diphtherie- und Poliomyelitis-Antikörpertiter dagegen stiegen deutlich an.

2.2.3. Wertbemessung von Pertussisimpfstoffen:

Die Wirksamkeit eines Pertussisimpfstoffes wird nach dem von KENDRICK et al. (47) ausgearbeiteten Mäuseschutztest bemessen und zwar durch Vergleich mit einer standardisierten Testvakzine (29).

Nach den Minimum-Requirements (61) muß eine Vakzine in der für die Grundimmunisierung nötigen Dosis (3 Injektionen) 12 Mäuseschutzeinheiten enthalten; für Vierfachimpfstoffe mit Polioquote werden sogar 14 Schutzeinheiten verlangt.

Die geforderten Schutzeinheiten müssen bei Verwendung von Fluidvaccine in höchstens 96×10^9 Keimen pro ml, bei Adsorbatimpfstoffen in 48×10^9 Keimen pro ml enthalten sein.

Ausgedehnte Feldversuche der MEDICAL RESEARCH COUNCIL (57,58) wiesen nach, daß die im intracerebralen Mäuseschutzversuch ermittelte Wirksamkeit einer

Vakzine mit der Schutzwirkung beim Menschen übereinstimmt.

2.3. Bisher geübte Impfverfahren

2.3.1. subkutane oder intramuskuläre Immunisierung:

2.3.1.1. prophylaktische Vakzination

Die meist praktizierte Immunisierung besteht aus drei Injektionen eines Einfach- oder Mehrfachimpfstoffes, welcher in einer Einzeldosis von 0,5 bis 1,0 ml tief subkutan oder intramuskulär verabreicht wird. Mit dieser Grundimmunisierung wird im dritten Lebensmonat begonnen, die Injektionen folgen im Abstand von 4 - 6 Wochen aufeinander. Eine Auffrischung nach einem Jahr wird empfohlen (15,40,59). Nach Vollendung des 2. Lebensjahres ist die Grundimmunisierung wegen der mit dem Alter der Kinder zunehmenden Begleitreaktionen nicht mehr angezeigt (40).

DI'SANT AGNESE (15,16), VAHLQUIST (83,84) und OSBORN (63) konnten nachweisen, daß bereits Neugeborene auf eine Impfung reagieren; diese Immunitätsbildung zeigte sich entweder in einer Antikörperbildung oder in einer Sensibilisierung des Organismus.

2.3.1.2. therapeutische Vakzination

Von der früher befürworteten (51) therapeutischen

Vakzination nach Ausbruch der Keuchhustenerkrankung wird heute von allen Autoren dringend abgeraten (37,40,41,51,65). Der dadurch erwünschte immunisatorische Effekt (50) kann sich durch die lange Anlaufzeit nicht auswirken; dagegen kommt es möglicherweise zu einer schädlichen Überschwemmung des Organismus mit Keuchhustentoxin (37).

2.3.2. Lokale Immunisierung:

2.3.2.1. Intranasale Immunisierung

Mit einer einzigen intranasal verabreichten Dosis konnte COOPER (14) nur eine lokale Immunität auslösen. NORTH (62) und ANDERSEN (2) wiesen eine generelle Immunität der Tiere nach. Dabei fand ANDERSEN, daß die intranasale Immunisierung stark von der Antigendosis abhängig war, und daß die höchsten Antikörpertiter nach der intranasalen Vakzinierung 4 Wochen nach der 1. Injektion auftraten.

2.3.2.2. Inhalations-Immunisierung

OTANI (64) entwickelte eine Immunisierung durch Inhalation von B.pertussis, die durch Züchtung auf Vitamin-C haltigen Nährböden entgiftet wurden, aber voll antigen blieben.

2.3.2.3. Orale Immunisierung

Über die orale Immunisierung gegen Pertussis ist sehr wenig bekannt. GITTERMANN et al. (30) konn-

ten Mäuse durch orale Gabe von abgetöteten Pertussis-Organismen immunisieren. Diese Ergebnisse konnten durch HOF und FINGER (42,43) nur teilweise bestätigt werden. Umfangreiche Untersuchungen über die Abhängigkeit der oralen Immunisierung von der Menge der Antigens (Ag), der Verabreichungsform u.s.w. liegen noch nicht vor.

2.4. Impfkomplikationen

So wenig Zweifel am Nutzen einer Impfung gegen Keuchhusten bestehen, so sicher ist auch, daß es gelegentlich zu unerwünschten Begleitreaktionen kommt.

Bei der Keuchhustenschutzimpfung treten dabei typische Reaktionen wie "persistant Screaming" - die Kinder schreien stundenlang - und Schock - die Kinder werden kurz nach der Impfung blaß und fallen um - beobachtet. In den meisten Fällen erholen sich die Kinder nach einigen Minuten bis mehreren Stunden (13).

MADSEN (56) berichtete als einer der ersten über schwere Komplikationen, die offensichtlich in Verbindung mit der Pertussisvakzinierung aufgetreten waren. Daraufhin erfolgten viele Umfragen in den verschiedenen Ländern und eine Anzahl von Berichten über Pertussis-Impfkomplikationen. Eine Zu-

sammenfassung hierüber gibt Tabelle 1 (3,4,5,10, 11,12,13,35,54,57,80,82,86,87).

Auffällig ist, daß diese Reaktionen innerhalb von wenigen Minuten bis zu 72 Stunden nach der Injektion des Antigens auftreten, so daß schon die enge zeitliche Korrelation auf einen Zusammenhang hindeutet. Die Reaktion scheint dabei unabhängig von der Art des Impfstoffes, ebenso von seiner Dosierung und der Anzahl der Injektionen zu sein (51).

Tabelle 1: Impfkomplikationen

Autor	Jahr	Anzahl der Fälle	Alter	Art der Komplikation
MADSEN	1933	2	1x Neugeborenen 1x Frühgeburt 1Woche alt	1x Krämpfe
WERNE	1946	2	10 Monate alt (Zwillinge)	Kollaps
BYERS u. MOLL	1948 (39-47)	15	5-18 Monate	Krämpfe
TOOMEY	1949	25	-	generalisierte Krämpfe
ANDERSON u. MORRIS	1950	1	2 Jahre und 7 Monate	generalisierte Krämpfe
HALPERN u. HALPERN	1955 (49-53)	50	1-9 Monate	Kramp fzustände
LÖW	1955	1	6 Monate	starker Krampf
CHAO	1957	1	3 Monate	hohes Fieber, Unfähigkeit den li.Arm zu heben

familiäre Vorgeschichte	Ausgang	Reaktions- beginn nach d. Injektion	Ort
in beiden Fällen z. Zeit der Geburt Keuchhusten in den Familien	2x Tod	1x 1/2 Std. 1x 2 Stdd.	Dänemark
1x Vater Allergiker 1x schrilles Schrei- en nach 1.Inj.	2x Tod	nach wenigen Stunden	New York
3x familiäre Epilep- sie oder Hydro- cephalus	2x Tod 9x bleibende Schäden des ZNS 1x gesund 3x unbekannt	20 Minuten - 72 Stunden	Boston
4x gleichzeitig andere Krankheit 5x früher Krämpfe	2x Tod Rest vollstän- dig erholt	-	Cleveland
Mumpsencephalitis mit 2 Jahren	geistig zurück- geblieben	36 Stunden	London
1x Cerebralinjury mit Konvulsionen 1x kurz zuvor Influenza	1x Tod 3x irreversible Gehirnschäden 11x vollständig erholt	10 Minuten - 96 Stunden	Dallas
nach 1.Injektion kurzer Krampf	Tod	12 Stunden	Chikago
-	geistig unter- entwickelt	-	Houston

Autor	Jahr	Anzahl der Fälle	Alter	Art der Komplikation
BAIRD	1957	9	4-9 Monate	Krämpfe
CHRISTEN- SEN	1963 (55-61)	22	15 unter 1 Jahr	Encephalopathie
BAINES	1965	2	-	Kollaps
STRÖM	1967 (59-65)	167	-	3 x Encephalopathie 80x Krämpfe 4 x Hyperarrhythmien 54x Schockzustände 24x abnorme Schreianfälle 2 x schwere Meningitiden
WEISE	1970 (65-70)	31	4 Monate - 2 Jahre	18x Encephalopathie 6 x Kollaps +Fieber 6 x Infiltrate, Abszesse, Allergien
COHEN	1973	8	-	Encephalopathien

familiäre Vorgeschichte	Ausgang	Reaktions- beginn nach d.Injektion	Ort
1x maternale Toxemia 1x placenta previa 1x Blutung während d.Schwangerschaft	infantile myoklonische Krampfleiden	2-4 Tage	Philadel- phia
-	15x mittel bis schwergradig geistig zurück- geblieben	-	USA
-	-	1x nach 3 Tg.	-
-	-	6 Stunden - 2 Tage	Schweden
-	3x Tod 1x geistige, 2x statische Entwicklungs- störung 1x beides kombi- niert 1x Epilepsie	-	BRD
4x primäre Virus- infektion	-	-	-

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. Tiermaterial, Haltungs- und Versuchsbedingungen

Als Versuchstiere dienten Mäuse; zum Serum-Antikörper-Nachweis verwendeten wir zusätzlich Meer-schweinchen.

3.1.1.1. Mäuse:

Bei den Mäusen handelte es sich um circa drei Wochen alte, weibliche, weiße NMRI Mäuse der Fa. Gassner mit einem Gewicht von 12 - 14 Gramm zu Beginn des Versuches. Je nach Versuchsanordnung setzten wir 6, 10 oder 20 Tiere zusammen in je einen Makrolonkäfig. Ihre Fütterung erfolgte mit pellettiertem Futter (Fa. Altromin, Lage/Lippe). Die Tränke bestand aus in Tropfflaschen abgefülltem Leitungswasser. Sowohl Futter als auch Wasser wurde ad libitum den Tieren angeboten.

Die Kontrolltiere lebten unter den gleichen Bedingungen.

3.1.1.2. Meerschweinchen:

Wir verwendeten weibliche, weiße, etwa 200 gr schwere Tiere (Fa. Bäumler) und fasten sie in Vierer-Gruppen zusammen. Sie erhielten ebenfalls pellettiertes Futter und als Tränke Leitungswasser - beides ad libitum.

3.1.2. Impfstoff

Für den größten Teil der Versuche stellte uns Professor Dr. ENGELHARDT, Behring AG, Marburg/Lahn, hitzeinaktivierte (30 Minuten bei 56 °C) Pertussis-Keimsuspension (Op.1193) zur Verfügung, welche mit Merthiolat 1 : 10000 versetzt waren. Abgefüllt in Flaschen zu je 100 ml enthielten sie 100×10^9 , 430×10^9 , 660×10^9 oder 1000×10^9 Keime pro ml.

Einige Versuche führten wir mit selbst hergestellten Pertussis-Keimsuspensionen durch. Dazu beimpften wir 50 mit Bordet-Gengou-Nährboden beschichtete Platten, ϕ 8,5 cm, mit frisch angezüchteten Pertussisbakterien (siehe unten), bebrüteten sie 30 Stunden bei 37 °C und nahmen den entstandenen Bakterienrasen mit Hilfe einer Platinöse ab. Die so gewonnenen Pertussisbakterien schwemmen wir in physiologischer NaCl

auf und bestimmten den Keimgehalt zunächst mit Hilfe einer auf B.pertussis geeichten Mc Farland Skala (siehe unten). Gleichzeitig stellten wir eine 10-er Verdünnungsreihe her, beimpften je drei Gengou-Agar-Platten mit je 0,1 ml jeder Verdünnungsstufe und zählten die gewachsenen Kolonien nach dreitägiger Bebrütung bei 37 °C aus. Die Hälfte der so gewonnenen Suspension erhielten die Tiere sofort als Lebendvakzine, der Rest wurde vor der Verabreichung 30 Minuten bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert.

3.1.3. Immunisierung

3.1.3.1. Mäuseimmunisierung:

Die Einzeldosis bei der oralen Applikation des Impfstoffes betrug zwischen 50 und 250×10^9 Keimen, bei der intraperitonealen Impfung dagegen nur etwa 1×10^9 . Diese Dosis verabreichten wir in einem Volumen von 0,3 oder 0,25 ml und zwar auf folgende Arten:

1. Magen: Unter maximaler Streckung des Kopfes der Maus schoben wir die auf eine Tuberkulinspritze aufgesetzte Knopfkanüle (70 x 1,5 mm) durch Maul, Schlund und Speiseröhre in den Magen vor; erst dann applizierten wir den

Impfstoff. Bei richtigem Sitz der Kanüle war dazu kein besonderer Druck nötig.

2. Oesophagus: Auch bei diesem Verabreichungsmodus erhielten die Tiere den Impfstoff mit der oben genannten Knopfkanüle. Die Entleerung der Vakzine erfolgte jedoch jetzt unmittelbar nach der Passage des Rachenringes.
3. Mundhöhle: Mit Hilfe einer Tuberkulinspritze tropften wir den Impfstoff in die Backentaschen der Tiere. Da die Mäuse die Gesamtdosis nicht auf einmal aufnahmen, verabreichten wir sie in vier aufeinanderfolgenden Durchgängen im Abstand von jeweils 10 Minuten.
4. Flasche: Die Tiere erhielten die Vakzine mit Leitungswasser vermischt - 9 ml Bakteriensuspension auf 50 ml Leitungswasser pro Tiergruppe - oder in konzentrierter Form - 0,25 ml Bakteriensuspension pro Tier plus 2 ml eventueller Tropfverlust - in normalen Trinkflaschen, nachdem ihnen mindestens zwei Stunden vorher das Trinkwasser entzogen worden war. Die Flüssigkeitsmenge war so berechnet, daß sie mindestens innerhalb von 12 Stunden von den Tieren aufgenommen wurde.
5. Zucker: Der Impfstoff wurde auf Zuckerwürfel geträufelt und den Tieren anstelle der Pellets

angeboten. Die Zuckermenge war so bemessen, daß die Tiere sie innerhalb von 24 Stunden fraßen. Um eine sichere Aufnahme zu gewährleisten, mußte den Tieren 24 Stunden vor Versuchsbeginn die Nahrung entzogen werden; doch selbst dann nahmen die Tiere den mit Pertussissuspension getränkten Zucker nur sehr widerwillig auf.

6. Intraperitoneal: Gemeinsam mit den oral immunisierten Tieren wurde eine Gruppe von 10 Tieren parenteral immunisiert. Die parenterale Impfstoffapplikation erfolgte durch intraperitoneale Verabreichung der Vakzine.

3.1.3.2. Meerschweinchenimmunisierung:

Bei der oralen Applikation betrug die Einzeldosis ca 25×10^9 Keime, bei der intraperitonealen 5×10^9 , welche in einem Volumen von 2,0 ml verabreicht wurden:

1. enteral: Bei diesem Verabreichungsmodus bedienten wir uns einer auf eine 2 ml Rekordspritze aufgesetzte Hartgummi-Magenschlundsonde. Um die Einführung der Sonde zu erleichtern, öffneten wir das Maul der Tiere mit einer Pinzette und hielten es mit ihrer Hilfe aufgespreizt. Dann benetzten wir die Spitze der Sonde mit Wasser und versuchten mit einem hängenden Wasser-

tropfen den Schluckreflex auszulösen, um dann die Sonde schnell in den Magen vorzuschieben. Erst hier applizierten wir den Impfstoff. Während dieses ganzen Vorgangs mußten die Tiere von einer Hilfsperson fixiert werden.

2. oral: Hierbei entleerten wir den Impfstoff aus einer 2 ml Spritze langsam in die Backentaschen der Tiere. Die Applikationsdauer betrug pro Tier 5 Minuten.
3. intraperitoneal: Gleichzeitig mit den beiden genannten Gruppen immunisierten wir auch eine Gruppe von vier Tieren parenteral, und zwar intraperitoneal.

3.1.4. Bakterienmaterial

Die Bakterien erhielten wir in lyophilisiertem Zustand, abgefüllt in Ampullen von der Fa. Behringwerke AG, Marburg/Lahn. Es handelte sich hierbei um den Stamm 40103 von Bordetella pertussis.

3.1.5. Nährboden

Für die Züchtung der Pertussis-Bakterien verwendeten wir ausschließlich die Bordet-Gengou-Agar-Base der Fa. Difco, welcher wir laut Vorschrift kurz vor der Fertigstellung steriles

Schafblut zusetzten, und zwar in einer Endkonzentration von 15 %.

3.1.6. Anzüchtung der Bakterien

3.1.6.1. lyophilisiertes Material:

Zur Anzüchtung der Keime öffneten wir jeweils eine Ampulle, schwemmten ihren Inhalt in 2 ml Nährbouillon auf und bebrüteten die erhaltene Keimsuspension 30 Minuten bei 37 °C. Anschließend spatelten wir sie auf jeweils drei Platten aus.

3.1.6.2. Gehirnmaterial:

Wiederholt entnahmen wir die Keime für die erste Anzüchtung den Gehirnen soeben gestorbener Mäuse eines laufenden Versuches. Dabei eröffneten wir die Schädelhöhle unter sterilen Kautelen und strichen die mit einer Platinöse entnommene Hirnsubstanz auf zwei Gengou-Platten aus.

Bei der Erstbebrütung erschienen die Kolonien nach 3 - 4 Tagen, bei Wiederverimpfung innerhalb von 24 - 48 Stunden. Alle drei bis vier Tage legten wir eine weitere Passage an.

3.1.7. Virulenzerhaltung der Bakterien

Die Nährbodenpassagen reichten für die Virulenz-erhaltung von B.pertussis nicht aus.

Nach etwa 10 fortlaufenden Nährbodenpassagen trat ein deutlicher Virulenzverlust der Keime ein. Die Kurzstäbchen wurden meist größer und unregelmäßig; manchmal sogar zu fädigen Organismen (53). Nur durch Mäusehirnpassagen und anschließende Neuanzüchtung der Bakterien aus der Hirnsubstanz schwer erkrankter Tiere ließ sich dieser irreversible Verlust der Pathogenität vermeiden.

3.1.8. Konservierung der Bakterien

Die beste Methode, immer über ein gleichbleibendes Bakterienmaterial verfügen zu können, besteht in der Lyophilisierung der Bakterien (33):

Nach 30-stündiger Bebrütung bei 37 °C nahmen wir die Bakterien vorsichtig von der Nährbodenoberfläche ab und suspendierten sie in einem flüssigen Nährsubstrat, bestehend aus steriler 0,85 %iger NaCl und steriler Magermilch im Verhältnis 2 : 1. Nach 20 Stunden Inkubation bei 37 °C zentrifugierten wir die Suspension 15 Minuten bei $1,5 \times 10^3 g$. Das erhaltene Sediment wurde von je 2 ml des oben genannten Mediums aus NaCl und Magermilch aufgenommen. Dieses Substrat übernahm die Rolle einer Schutzlösung.

In Ampullen mit je 0,5 ml Keimsuspension lyophilisierten wir die Bakterien und bewahrten sie anschließend bei 4 °C für die gesamte Dauer unserer Versuche (12 Monate) ohne Virulenzverlust auf.

3.1.9. Diagnostizierung und Differenzierung von Bordetella pertussis

Um eine Verunreinigung der Bakterienkulturen durch artfremde Bakterien oder Pilze auszuschalten führten wir laufend Kontrollen durch. Diese bezogen sich auf:

3.1.9.1. Makroskopische Beurteilung des Kolonienwachstums:

Die ersten Kolonien, die sich bei den Subkulturen nach 30-stündiger Bebrütung bei 37 °C zeigten, erschienen als silbrig glänzender Hauch auf der Nährbodenoberfläche. Nach zwei bis drei Tagen waren die einzelnen Kolonien als scharf umrandete, kreisrunde, undurchsichtige Punkte mit hämolytischem Hof erkennbar (8,19,32,68).

3.1.9.2. Mikroskopische Untersuchung der Bakterien:

Nach jeder Anzüchtung der Bakterien und vor jedem Infektionsversuch fertigten wir Bakterienausstriche an und färbten sie nach Gram. B.pertussis zeigte sich als gram negatives, ellipsoides Stäbchen.

Zur Differenzierung gegenüber B.influenzae war die Färbung mit Karboltoluidinblau notwendig. Im Gegensatz zu B.influenzae weist B.pertussis Polfärbung auf (32).

3.1.10. Keimzahlbestimmung

Sie erfolgte mittels der Trübungsmessung nach Mc FARLAND (34); die Bariumsulfat-Trübungsreihe eichten wir hierzu für B.pertussis:

Röhrchen Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl ₂ 1%ig (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
H ₂ SO ₄ 1%ig (ml)	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0
Bakterienzahl pro ml x 10 ⁸	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20

Bei der Anzüchtung der Bakterien für die Eichung der Mc FARLAND Skala verfahren wir wie bei der Herstellung der Bakteriensuspensionen für die Infektion der Tiere.

Die konzentrierte Bakteriensuspension diente als Ausgangsmaterial für eine zweier Verdünnungsreihe; die Trübung der einzelnen Verdünnungsstufen verglichen wir mit der Trübung der zehn Röhrchen der Bariumsulfat-Skala und vermerkten korrespondierende Trübungsgrade. Nach dreitägiger Bebrütung der Verdünnungsstufen und Auszählung der gewachsenen

Kolonien konnten wir jedem Vergleichsröhrchen eine bestimmte Anzahl Pertussisbakterien zuordnen.

3.1.11. Belastungsversuche

Jeweils am 16. Tag nach der letzten Immunisierung infizierten wir die Tiere. Wir verfahren dabei nach einem von H.FREUDENSTEIN (29) geschilderten Verfahren (siehe Tabelle 2).

Die für die Infektion benötigten B.pertussis-Bakterien züchteten wir, wie oben geschildert, an. Die Bakterien der letzten Passage (6 beimpfte Platten, ϕ 8,5 cm, dritte oder vierte Passage) wurden 30 Stunden bei 37 °C bebrütet, mit einer Platinöse abgenommen und in 2 ml steriler physiologischer NaCl aufgeschwemmt.

Aus dieser konzentrierten Suspension, deren Keimgehalt wir mit Hilfe der Mc FARLAND Skala bestimmten, stellten wir eine Verdünnungsreihe her, welche die zur Infektion der immunisierten Tiere und der Kontrolltiere dienende Keimverdünnung und die verschiedenen Stufen für die Titration der LD₅₀ enthielt. Meist benützten wir für die Infektion der Mäuse die 100-fache Verdünnung der konzentrierten Suspension.

Vor der intracerebralen (i.c.) Infektion betäub-

ten wir die Tiere kurz mit Äther; zur Injektion des benötigten Volumens - pro Maus 0,02 ml - nahmen wir Tuberkulinspritzen und 16-er Einmal-kanülen. Die Einstichstelle lag etwas über dem Auge in Richtung auf das gegenüberliegende Ohr. Zuerst wurden die oral immunisierten Tiere, dann die intraperitoneal immunisierten Tiere eines Tests infiziert und zuletzt die Kontrolltiere und die Titrationstiere zur Bestimmung der LD₅₀ nach der Methode von REED und MUENCH (73).

Die Anzahl der lebenden Keime stellten wir vor - und auch oft nach - der Infektion der Tiere durch eine 10-er Verdünnung des Infektionsmaterials fest. Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied bei der Keimzahlbestimmung vor oder nach Beendigung der Infektion.

Meist wurde der gesamte Infektionsversuch innerhalb von 1 - 2 Stunden durchgeführt, so daß während dieses Zeitraums kein Virulenzabfall der Bakterien eintreten konnte; um eine eventuelle Auswirkung in dieser Richtung nicht ins Gewicht fallen zu lassen, infizierten wir die Kontrolltiere stets als letzte Gruppe.

Nach zehn Tagen galt der Versuch als beendet. Tiere, die zu diesem Zeitpunkt noch keine Krankheitssymptome (gesträubtes Fell, gekrümmter Rück-

ken, angeschwollene Augen und Nasenlöcher, konvulsive Bewegungen, erschwerter Atem (47)) zeigten, wurden den gesunden Tieren zugerechnet.

Die Berechnung der LD_{50} wurde nach der Methode von REED und MUENCH (73) durchgeführt und die LD_{50} des Infektionsmaterials bestimmt.

Wir infizierten die Tiere in unseren Versuchen mit Belastungsdosen zwischen 100 und 2400 LD_{50} . Doch nach den Untersuchungen von HOLT (44) ist die Höhe der Challengedosis für die Überlebensrate der Mäuse nicht maßgebend, da sich die lebenden Mikroben in den Gehirnen der infizierten Tiere immer erst bis auf eine Anzahl von 10^5 - 10^6 Keimen vermehren müssen, ehe die von ihnen verursachte Entzündung so stark ist, daß die Blut-Hirnschranke durchlässig wird. Der Ausbruch der Infektion hängt dann ganz allein von der Höhe der spezifischen Immunität ab. Bei immunisierten Tieren führt die Eliminierung der Infektion zur Wiederherstellung der normalen Barriere - etwa ab dem 6. Tag. Bei ungeschützten Mäusen (8) vermehren sich die Mikroben beständig, bis zum Tod der Tiere.

Ausfälle in den ersten drei Tagen nach der Infektion werden deshalb auch als durch den Eingriff hervorgerufen angesehen und nicht gewertet.

Tabelle 2: Versuchsschema nach H.FREUDENSTEIN (29)

Versuchs- tag	Arbeitsvorgang	
	im Tierraum	im Laboratorium
	Mäuse gruppieren	Impfstoff auf die gewünschte Konzentration einstellen
	Immunisierungen letzte Immunisierung	
1 5 9 12 15	(16 Tage)	Anzüchtung d.Keime 1. Passage 2. Passage 3. Passage 4. Passage
16	Infektion	Keime suspendieren Keimdichte einstellen Keime ausimpfen
20	(14 Tage)	Kolonien auszählen
30	Tiere absetzen	Auswertung

3.1.12. Auswertung der Belastungsversuche

Nach Ablauf der Prüfung wurde die Zahl der überlebenden Tiere im Verhältnis zur Tierzahl drei Tage nach der Infektion gesetzt:

$$\frac{\text{überlebende Tiere}}{\text{infizierte Tiere}}$$

Diese Überlebensrate läßt sich auch in Prozent ausdrücken.

3.1.13. Serumgewinnung

Das für die serologischen Untersuchungen benötigte Blut wurde durch Herzpunktion gewonnen; bei den Mäusen auch durch Punktion des Plexus chorioidalis mit Hilfe von Pasteur-Pipetten im nasalen Augwinkel.

Die Lagerung der Seren erfolgte bis zum Zeitpunkt der Auswertung bei -20°C .

3.1.14. Antikörperbestimmung

3.1.14.1. Bestimmung des Agglutinationstiter:

Die Agglutinationsteste wurden nach der von J.MILLER (60) beschriebenen Technik, modifiziert nach J.POWELL (71) und F.DA GARA (17) durchgeführt.

3.1.14.2. Antikörper-Bestimmung nach einer modifizierten Mancinitechnik:

Entgegen der üblichen Mancinitechnik, bei welcher dem verwendeten Agar Serum beigemischt wird, versetzten wir ihn mit einem löslichen Pertussis-Antigen (81) und beschichteten mit je drei ml' dieses Gemisches je einen Objektträger und ließen von jeweils zwei eingestanzten Löchern (ϕ 3 mm) je 0,03 ml des zu untersuchenden Serums in das Medium diffundieren. Nach dreitägiger Bebrütung bei 37 °C, 24-stündiger Elution, 15-minütiger Färbung mit Amidoschwarz und darauffolgender Entfärbung mit einem Gemisch aus Eisessig und Methanol (1:9) konnte das Ergebnis abgelesen werden. Die AgAk (Antigen-Antikörper)-Reaktion zeigte sich als gefärbte Fläche um die mit Serum beschickten Löcher. Die Stärke der jeweiligen Reaktion wurde mit der eines Pertussishyperimmunglobulins (Behringwerke AG) verglichen.

3.2. ERGEBNISSE

3.2.1. Vorversuche

3.2.1.1. Ak-Bestimmung nach oraler Immunisierung von Meerschweinchen:

Im ersten Vorversuch wollten wir klären, ob eine orale Immunisierung mit Pertussisvakzine grundsätzlich möglich, und vielleicht auch anhand eines Antikörper-Nachweises im Serum der immunisierten Tiere zu erfassen ist.

Dazu immunisierten wir an drei aufeinanderfolgenden Tagen Meerschweinchen mit Hilfe einer Magenschlundsonde mit unterschiedlich zubereitetem Bakterienmaterial von etwa gleichem Ag-Gehalt. Die Kontrolltiere erhielten die entsprechenden Mengen physiologischer NaCl.

Das vor Versuchsbeginn und 28 Tage nach Beendigung der Immunisierung gewonnene Serum eines jeden Tieres wurde auf seinen Agglutiningehalt untersucht.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Ak-Bestimmung gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Ergebnis des Meerschweinchenversuches

	Anzahl der Tiere	Gesamt- menge Ag $\times 10^9$	Ag-Zubereitung	Agglutina- tionstiter
Gruppe A	4	4,2	Pertussisbak- terien, virulent	A ₁ 1:10
				A ₂ 1:10
				A ₃ 1:40
				A ₄ -
Gruppe B	4	4,2	Pertussisbak- terien, hitze- inaktiviert (30 Minuten bei 56°C)	B ₁ -
				B ₂ -
				B ₃ 1:10
				B ₄ 1:40
Gruppe C	4	4,8	Pertussisbak- terien, der Behringwerke AG (hitzeinak- tiviert und konserviert mit Merthiolat 1:10000)	C ₁ 1:80
				C ₂ 1:..
				C ₃ 1:80
				C ₄ -
Gruppe D	4		physiol. NaCl	-

Nach der oralen Applikation von Pertussis-Bakterien waren drei Wochen nach Abschluß der Immunisierung Agglutinine im Serum der Meerschweinchen nachweisbar. Die höchsten Titer - bis zu 1:160 - fanden wir bei der Tiergruppe, der wir hitzeinaktivierte (30 min. bei 56 °C) und mit Merthiolat (1:10000) versetzte Vakzine der Behringwerke AG verabreicht hatten, in einer Gesamtmenge von $4,8 \times 10^9$ PO (Pertussis-Organismen). Mit dieser Ag-Zubereitung führten wir deshalb die Hauptversuche durch.

Da der Ak-Nachweis kein genaues Bild des Immunisierungsgrades gibt (1,17,21,31,36,85), Meerschweinchen sich aber nicht mit Pertussisbakterien infizieren lassen, setzten wir unsere Versuche mit Mäusen, in Form von Mäuseschutzversuchen fort.

3.2.1.2. Ergebnis von Belastungsversuchen nach oraler Immunisierung von Mäusen mit der handelsüblichen Pertussis-Vakzine:

Wir verabreichten drei Gruppen von je 10 Tieren an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 0,3 ml der handelsüblichen Pertussisvakzine mit 30×10^9 Keimen pro ml.

Sie erhielten eine Gesamtdosis von 27×10^9 PO,

und zwar über eine Knopfkanüle, eine Flasche oder intraperitoneal (i.p.). Weitere 10 Tiere blieben als Kontrollen unbehandelt.

Drei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere mit 935 LD₅₀ (Dosis letalis 50%) infiziert. Diese Infektion überlebte keines der Kontrolltiere, 100 % der i.p. immunisierten Tiere, und je 20 % der über die Knopfkanüle oder die Flasche vakzierten Tiere.

Auf Grund des Ergebnisses dieses Vorversuches verwendeten wir für die Hauptversuche eine mindestens 10-fach höhere Ag-Dosis für die enterale Applikation.

3.2.2. Hauptversuche

3.2.2.1. Ergebnis der Belastungsversuche an Mäusen nach unterschiedlichen Applikationsarten bei der enteralen Immunisierung

Um den günstigsten Applikationsmodus für die orale Immunisierung von Mäusen zu finden, verabreichten wir eine einheitliche Impfdosis von 500×10^9 PO, verteilt auf drei Gaben im Abstand von je 24 Stunden:

1. mit der Sonde in den Magen,
2. mit der Sonde in den Oesophagus,

3. mit einer Spritze in die Mundhöhle,
4. über die Flasche,
5. auf Zuckerwürfel geträufelt.

Zur Kontrolle immunisierten wir eine Gruppe von Mäusen i.p. mit einer Gesamtdosis, die 1/100 der enteral verabreichten Dosis betrug.

Um etwaige unspezifische Immunisierungsvorgänge festzustellen, führten wir noch drei weitere Kontrollgruppen mit; diese erhielten Eiklar oder physiol. NaCl über die Sonde oder blieben vollkommen unbehandelt.

Die nach 14 Tagen gesetzte Belastungsinfektion mit 1111 LD₅₀ überlebte keines der Kontrolltiere. Die i.p. immunisierten Mäuse zeigten sich gegenüber der Challengeinfektion am besten geschützt, und zwar zu 86,7 %; darauf folgten Gruppe 1 mit 60 %, Gruppe 2 mit 57,1 %, Gruppe 3 mit 35,7 %, Gruppe 4 mit 33,3 % und Gruppe 5 mit 13,3 %.

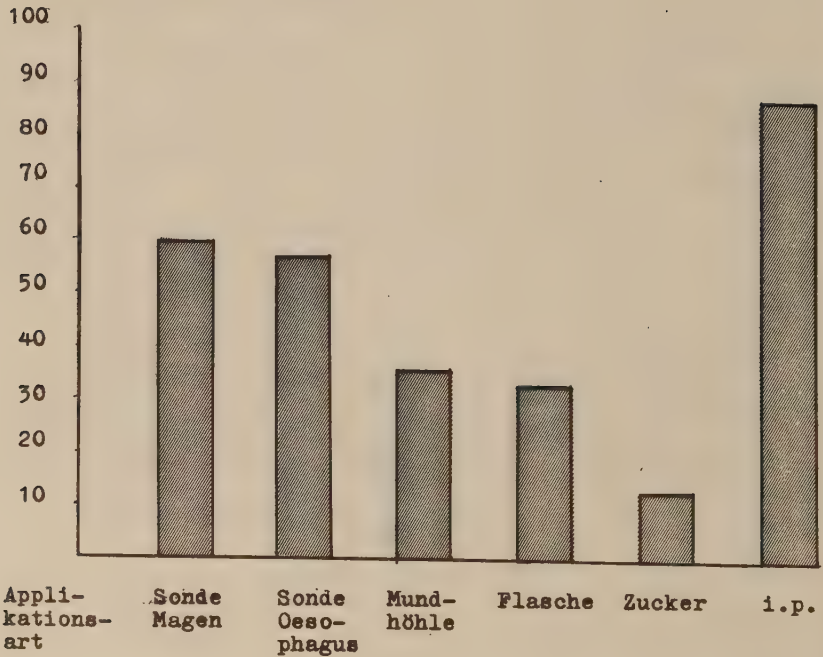
Insgesamt fiel der annähernd gleiche Immunisierungsgrad der Gruppen 1 und 2 einerseits und der Gruppen 3 und 4 andererseits auf, weiterhin der deutliche Unterschied zwischen den beiden genannten Gruppenpaaren zu Gruppe 5.

Tabelle 4: Einfluß verschiedener Applikationsarten
auf die Wirksamkeit einer aktiven Per-
tussis-Immunisierung bei der weißen Maus

Applikationsart	Zahl der Tiere	Einzel- dosis in 0,25 ml $\times 10^9$	Gesamt- dosis $\times 10^9$	LD ₅₀ des Infekt. mate- rials	Effektivität %	
Sonde Magen	15	165	500	1111	9/15	60
Sonde Oesophagus	14	165	500	1111	8/14	57,14
Mundhöhle	14	165	500	1111	5/14	35,71
Flasche	15	165	500	1111	5/15	33,33
Zucker	15	165	500	1111	2/15	13,33
i.p.	15	1,5	4,5	1111	13/15	86,66
Eiklar mit Sonde	15			1111	0/15	0
NaCl mit Sonde	15			1111	0/15	0
Kontrolle	15			1111	0/15	0

zu Tabelle 4: Vergleichende schematische Darstellung
der Effektivität der Immunisierung von
Mäusen mit Pertussis-Bakterien bei unter-
schiedlichen enteralen Applikationsarten

Effektivität (%)



3.2.2.2. Ergebnis der Belastungsversuche an Mäusen nach einer Booster-Immunisierung

Im folgenden Versuch wollten wir die Wirkung einer Boosterung klären. Bei gleichbleibenden Einzeldosen von $130 \times 10^9/0,3$ ml stellten wir bei den beiden unterschiedlichen enteralen Applikationsarten, mit der Sonde oder mit der Flasche, die Effektivität der Immunisierung nach dreimaliger Verabreichung der Vakzine im Abstand von je 12 Stunden der Impfwirksamkeit einer zusätzlichen Boosterung nach 14 Tagen gegenüber.

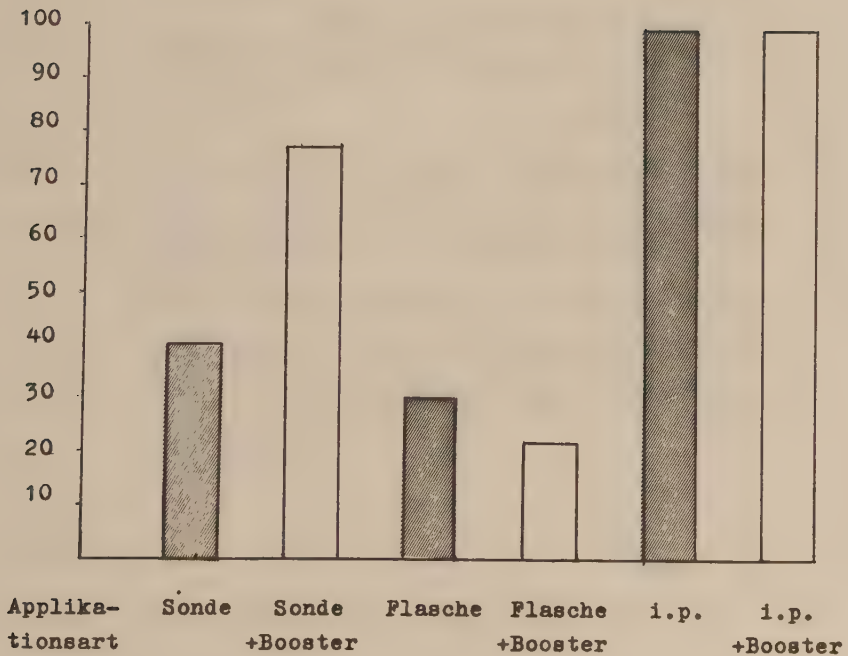
Keines der Tiere der Kontrollgruppe überlebte die Infektion; dagegen erwiesen sich die i.p. immunisierten Tiere vor und nach der Boosterung als zu 100 % gegenüber der Infektion geschützt. Bei den mit der Sonde immunisierten Tieren fanden wir eine deutliche Verbesserung der Immunität von 78 % nach der Boosterung gegenüber 40 % davor. Überraschend fiel das Ergebnis bei den mit der Flasche immunisierten Tieren aus, bei denen die Tiere nach der Boosterung mit 22 % schlechter als vor der Boosterung (30 %) gegenüber der Challengeinfektion geschützt waren.

Tabelle 5: Einfluß einer Boosterimmunisierung auf die Wirksamkeit einer aktiven Pertusis-Immunisierung bei der weißen Maus

Applikationsart	Applikations- rythmus	Zahl der Tiere	Einzel- dosis in 0,3 ml $\times 10^9$	Gesamt- dosis $\times 10^9$	LD ₅₀ des Inf. mat.	Effektiv- tät	%
Sonde	3x im Abstand von 12 Std.	20	130	390	496	8/20	40
Sonde	+ Booster	20	130	520	147	14/18	78
Flasche	3x im Abstand von 12 Std.	20	je 9 ml Bakt.- Suspension	496	6/20	30	
Flasche	+ Booster	20	(430 $\times 10^9$ /ml) auf 50 ml H ₂ O	147	4/18	22	
i.p.	3x im Abstand von 12 Std.	20	1,3	3,9	496	20/20	100
i.p.	+ Booster	20	1,3	5,2	147	20/20	100
Kontrolle		10			496	0/10	0
Kontrolle		10			147	0/10	0

zu Tabelle 5: Vergleichende schematische Darstellung der
Effektivität der Immunisierung von Mäusen
mit Pertussis-Bakterien nach einer Booster-
Immunisierung

Effektivität (%)



3.2.2.3. Ergebnis der Belastungsversuche an Mäusen mit unterschiedlichen Impfrhythmen

Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob sich der Impfrhythmus bei gleichbleibender Einzel- ($150 \times 10^9/0,25 \text{ ml}$) und Gesamtdosis (450×10^9) auf den Grad der Immunitätsbildung auswirkt.

Die mit der Flasche immunisierten Tiere erhielten die Keimsuspension in konzentrierter Form, ohne Hinzufügen von Leitungswasser.

Die Verabreichung der Vakzine erfolgte in folgenden Rhythmen:

1. 3x im Abstand von 3 Tagen
2. 2x im Abstand von 2 Tagen + Booster nach 14 Tagen

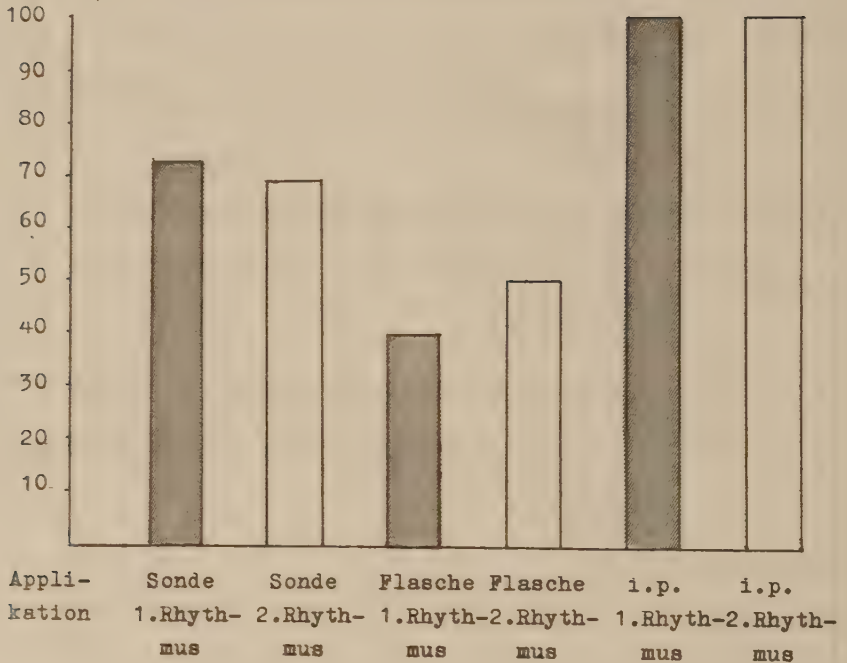
Die Effektivität der Impfung lag bei der Sonden-Immunsierung bei beiden Impfrhythmen etwa gleich, sie schwankte zwischen 73 % und 69 %. Bei der Immunsierung über die Flasche erwies sich das zweite Impfschema als wirksamer, es erzielte eine Effektivität von 50 % gegenüber 40 % bei ersterem.

Tabelle 6: Einfluß unterschiedlicher Impfrhythmen
auf die Wirksamkeit einer aktiven Per-
tussis-Immunisierung bei der weißen Maus

Applikati- onsart	Applikations- rhythmus	Zahl der Tiere	Einzel dosis in 0,25ml $\times 10^9$	Gesamt dosis $\times 10^9$	LD ₅₀ des Inf. mat.	Effektiv- tät	%
Sonde	3x im Abstand von 3 Tagen	22	150	450	992	16/22	73
Sonde	2x im Abstand von 2 Tagen + Booster nach 14 Tagen	26	150	450	1605	18/26	69
Flasche	3x im Abstand von 3 Tagen	20	150	450	992	8/20	40
Flasche	2x im Abstand von 2 Tagen + Booster nach 14 Tagen	20	150	450	1605	10/20	50
i.p.	2x im Abstand von 6 Tagen	20	1,5	4,5	992	20/20	100
i.p.	2x im Abstand von 6 Tagen + Booster nach 14 Tagen	20	1,5	4,5	1605	20/20	100
Kontrolle		10			992	0/10	0
Kontrolle		10			1605	0/10	0

zu Tabelle 6: Vergleichende schematische Darstellung
der Effektivität der Immunisierung von
Mäusen mit Pertussis-Bakterien bei unter-
schiedlichen Impfrhythmen

Effektivität (%)



3.2.2.4. Ergebnis der Belastungsversuche an Mäusen
nach Applikation verschiedener Ag-Dosen

Zuletzt stellten wir die Frage, ob sich durch eine ständige Steigerung sowohl der Einzel- als auch der Gesamtdosis - erstere kontinuierlich ansteigend - eine Erhöhung des Immunisierungsgrades erreichen läßt.

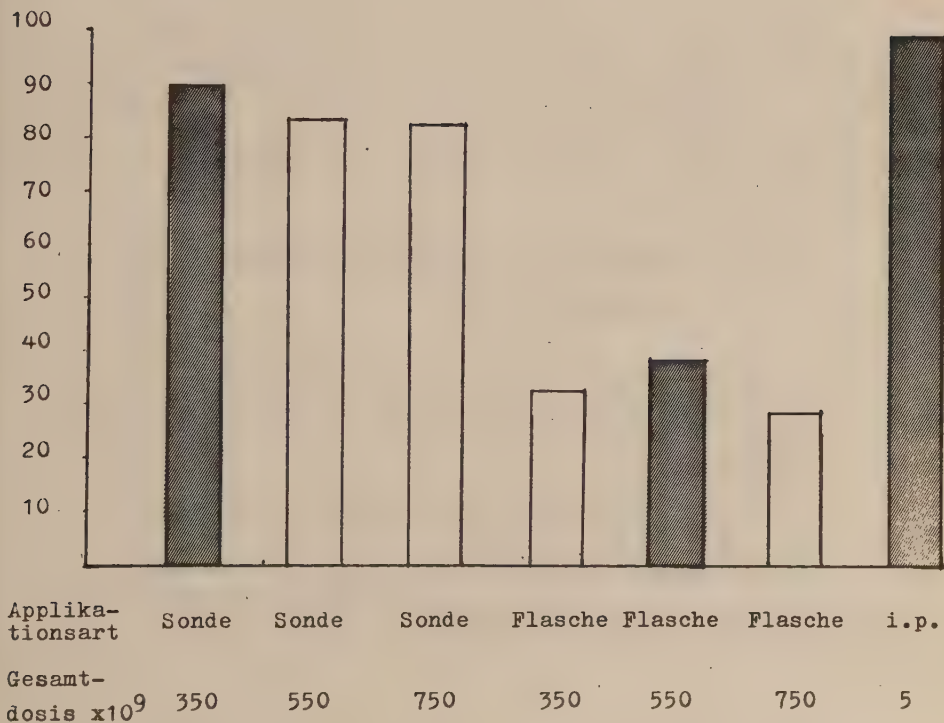
In keiner der Versuchsgruppen waren die Tiere mit der höchsten Gesamtdosis (750×10^9) am besten geschützt. Bei den mit der Sonde immunisierten Tieren erzielten wir bei der Vakzinierung mit der niedrigsten Gesamtdosis von 350×10^9 die höchste Effektivität; bei den mit der Flasche immunisierten Tieren überlebten die Tiere, welche die mittlere Gesamtdosis von 550×10^9 erhalten hatten, zum höchsten Prozentsatz die Infektion mit 1923 LD₅₀.

Tabelle 7: Einfluß unterschiedlicher Antigen-Dosen
auf die Wirksamkeit einer aktiven Per-
tussis-Immunisierung bei der weißen Maus

Appli- kations- art	Zahl der Tiere	Vakzinedosis x 10 ⁹ /0,25ml			Gesamt dosis x 10 ⁹	LD ₅₀ des I.M.	Effektivität	%
		I	II	III				
Sonde	40	50	100	200	350	1923	36/40	90
Sonde	38	100	200	250	550	1923	32/38	84
Sonde	36	250	250	250	750	1923	30/36	83
Flasche	36	50 (15ml)	100 (15ml)	200 (15ml)	350	1923	12/36	33
Flasche	36	100 (15ml)	200 (15ml)	250 (15ml)	550	1923	14/36	39
Flasche	34	250 (15ml)	250 (15ml)	250 (15ml)	750	1923	10/34	29
i.p.	20	2,5		2,5	5,0	1923	20/20	100
Kontrolle	20					1923	0/20	0

zu Tabelle 7: Vergleichende Darstellung der Immuni-
sierung von Mäusen mit Pertussis-Bakterien
bei ansteigenden Impfstoffdosen

Effektivität (%)



3.2.2.5. Verträglichkeitsprüfung der enteral verabreichten Pertussis-Bakterien

Während der Versuche wurden die Tiere auf ihr Allgemeinbefinden hin beobachtet.

Dabei fanden wir bei keinem der Versuchstiere auch nur das geringste Anzeichen einer krankhaften Veränderung; unabhängig von der Applikationsart, dem Applikationsrhythmus und der Höhe der Dosierung - bezogen auf die Einzel- und Gesamtdosis - entwickelten sich die enteral immunisierten Tiere ebenso gut wie die parenteral immunisierten und die Kontrolltiere, und standen diesen weder in der Futteraufnahme noch in der Gewichtszunahme in irgendeiner Weise nach. Man konnte sie als klinisch gesund betrachten.

3.2.2.6. Ergebnisse der Antikörperbestimmung bei den Mäuseversuchen

Die bei allen Mäuseversuchen durchgeführten Agglutinationsproben blieben ohne auswertbare Ergebnisse.

Bei den Serumuntersuchungen mit Hilfe einer modifizierten Mancinitechnik, welche wir beim letzten Versuch zusätzlich durchführten, fanden wir da-

gegen eine gute Korrelation zwischen dem Ausmaß der AgAk-Reaktion und der in den Mäuseschutzversuchen gefundenen Belastbarkeit der Tiere.

Die Tiere mit der höchsten Effektivität bei der oralen Vakzinierung zeigten auch die stärkste Reaktion (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Überblick über die AgAk-Reaktion im letzten Mäuseversuch zum Zeitpunkt der Infektion der Tiere und 14 Tage später bei den Überlebenden der Infektion

Applikations- art	Gesamt- dosis $\times 10^9$	Effek- tivi- tät d. Impf. %	Durchmesser der AgAk-Reaktionsfläche (mm) zur Zeit der Infektion	nach Überstehen d.Inf.
Sonde	350	90	7,0	8,4
Sonde	550	84,2	10,2	8,4
Sonde	750	83,3	7,8	7,6
Flasche	350	33,3		6,4
Flasche	550	38,9		8,0
Flasche	750	29,4		6,0
Kontrolle				-
Pertussishyperimmunserum				18

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Im Rahmen unserer Untersuchungen wollten wir folgende Fragen im Tierversuch klären:

1. Läßt sich durch die orale Applikation von Pertussis-Antigen eine Immunität der Tiere erreichen?
2. Ändert sich die Wirksamkeit der Impfung parallel mit der Erhöhung der Ag-Konzentration?
3. Beeinflußt die Art der Applikation den Impfschutz der Tiere?
4. Verbessert eine Boosterimmunisierung den Immunitätsgrad der Tiere?
5. Wirkt sich eine Veränderung des Impfrhythmus auf die Effektivität der Vakzinierung aus?
6. Finden sich Hinweise auf eine Unverträglichkeit der enteral verabreichten Pertussis-Bakterien?
7. Besteht zwischen dem Impfschutz und dem Ausmaß der Ak-Bildung eine Korrelation?

Die durchgeführten Versuche beweisen, daß eine orale Immunisierung von Mäusen gegen eine Pertussisinfektion grundsätzlich möglich ist.

Wie BALJER et al. (6) und STARFLINGER (79) bei der oralen Applikation von Tetanus-Toxoid, konnten wir

die Wirksamkeit der Impfung durch Erhöhung der Antigendosen steigern. Eine Anhebung der Gesamtdosis von 27×10^9 PO auf 350×10^9 PO verbesserte die Impfwirksamkeit von 20 auf 90 %. Bei der Verabreichung der Vakzine mit der Sonde führte die weitere Erhöhung sowohl der Einzeldosis als auch der Gesamtdosis - bis zu 750×10^9 - zu keiner Steigerung der Impfwirksamkeit. Bei der Applikation über die Flasche konnten wir im gleichen Versuch mit einer Gesamtdosis von 550×10^9 PO den besten Impfschutz der Tiere erzielen; auch bei dieser Immunisierungsart konnten wir durch die Erhöhung der Ag-Dosis auf 750×10^9 den Impfschutz nicht verbessern. Man kann also annehmen, daß ab einem bestimmten Dosis-Grenzwert bei beiden Applikationsarten (Sonde und Flasche) eine Erhöhung der Antigenmenge zu keiner weiteren Steigerung der Wirksamkeit führt.

Der Impferfolg scheint bei der enteralen Applikation in großem Ausmaß vom Applikationsort beeinflusst zu werden. Während BALJER et al. (6) den besten Impferfolg hatten, wenn sie das Tetanus-Toxoid direkt in die Mundhöhle verabreichten, erzielten wir die besten Immunisierungsergebnisse bei der Verabreichung der PO in den Magen oder in den Oesophagus

(60 bzw. 57 %). Eine deutliche Abnahme der Impfwirksamkeit erhielten wir bei der Gabe des Impfstoffes direkt in die Mundhöhle oder über die Flasche; doch auch bei diesen Applikationsarten lag die Effektivität etwa auf gleicher Höhe (36 bzw. 33 %).

BALJER et al. (6) führten ihre Erfolge bei der Applikation des Toxoids direkt in die Mundhöhle auf seinen längeren und intensiveren Kontakt mit der Schleimhaut der Mundhöhle zurück. Doch auch bei unseren Versuchen wehrten sich die Tiere bei der Applikation des Antigens in die Mundhöhle gegen die Manipulation und nahmen nur ein Viertel der Gesamtdosis auf einmal auf, so daß sich der Immunisierungsvorgang auf insgesamt 40 Minuten ausdehnte. Auch hier war durch die lange Verweildauer des Antigens ein intensiver Kontakt mit der Mundschleimhaut gegeben ohne zu besonders gutem Impfschutz zu führen. Dieser unterschiedliche Impferfolg bei der enteralen Gabe von Tetanus-Toxoid und Pertussis-Antigen läßt vermuten, daß beide ihre immunogene Wirkung an verschiedenen Orten entfalten (7,42,43).

Bei unseren guten Ergebnissen der Sondenimmunisierung gegenüber der Verabreichung des Impfstoffes direkt in die Mundhöhle oder über die Flasche könnte die Zeitdauer des Immunisierungsvorganges eine Rolle spielen. Bei der Applikation der Vakzine über die

Sonde dauerte der gesamte Impfvorgang nur wenige Sekunden; bei der direkten Verabreichung in die Mundhöhle erstreckte er sich über 40 min. Die Immunisierung über die Flasche war erst nach ca 6 Stunden, und die über die Zuckerwürfel (Effektivität 0) sogar erst nach 24 Stunden abgeschlossen.

Oft wird die gute Immunitätsbildung nach der Sondierung auf eine mechanische Verletzung des Oesophagus oder Eindringen von Vakzine in die Atemwege zurückgeführt. Untersuchungen von HOF und FINGER (42) sprechen gegen diese Annahme. Einer parenteralen Injektion von mindestens 5×10^9 abgetöteten PO folgt bei Mäusen regelmäßig Splenomegalie und Lymphozytose (43,22,23), durch 1×10^9 PO wird bei Mäusen eine Schockbereitschaft gegenüber Rinderserumalbumin (RSA) induziert. Falls es nun bei den sehr hohen Dosen ($2,5 \times 10^{11}$) bei der Sondierung zu kleinen Verletzungen käme, würden sehr rasch $1 - 5 \times 10^9$ PO in die Zirkulation gelangen und die genannten Veränderungen hervorrufen. Die Autoren selbst konnten jedoch auch bei Dosen von 6×10^{11} in einem Volumen von 0,5 ml bei Sondierung weder Splenomegalie noch Lymphozytose, noch die Ausbildung einer anaphylaktischen Schockbereitschaft beobachten.

Auch durch die Wahl des Impfrhythmus ließ sich der Impferfolg beeinflussen. Für jede Applikationsart

schien ein anderer Impfrhythmus am erfolgversprechendsten.

So führte bei der Sondierung in den Magen eine dreimalige Immunisierung im Abstand von je 12 Stunden bei einer zusätzlichen Boosterung nach 14 Tagen zu einem Anstieg der Effektivität von 40 auf 78 %, während sich dies bei der Vakzinierung über die Flasche nicht auswirkte.

Bei der Gabe des Antigens mit der Flasche dagegen erzielten wir den besten Impferfolg bei einer zweimaligen Immunisierung im Abstand von 2 Tagen mit einem Booster nach 14 Tagen. Bei diesem Impfschema erwiesen sich 50 % der Tiere gegenüber der Challengeinfektion geschützt.

Selbst bei der Verabreichung von extrem hohen Ag-Dosen von $2,5 \times 10^{11}$ konnten bei keinem der Versuchstiere Unverträglichkeitsreaktionen beobachtet werden. Die Unschädlichkeit des oral verabreichten Pertussis-Antigens kann somit angenommen werden.

Mit einer modifizierten Mancinitechnik ließen sich nach der enteralen Immunisierung der Mäuse Antikörper im Serum nachweisen, in enger Korrelation zu der jeweiligen im Mäuseschutzversuch gefundenen Belastbarkeit der Tiere.

GITTERMANN et al. (30) fanden bei ihren Versuchen bei der enteralen Applikation von Pertussis-Antigen stets einen 100 %igen Schutz der Tiere gegenüber der intracerebral gesetzten Infektion. Dies konnten unsere Untersuchungen nicht bestätigen. Die Ergebnisse unserer Versuche lassen sich dagegen mit denen von HOF und FINGER (42,43) vergleichen. Sie erzielten mit einer Dosis von $2,5 \times 10^{11}$ abgetöteten Pertussisorganismen bei 54 % ihrer Versuchstiere einen Schutz gegenüber der i.c. Infektion mit einer letalen Dosis von virulenten Pertussisbakterien. Durch Variierung von Ag-Dosis und Applikationsrhythmus konnten wir mit Hilfe der Sondierung von Mäusen mit Pertussis-Antigen einen Impfschutz bis zu 90 % erreichen.

Ziel unserer Untersuchungen war, durch Tierversuche eine Grundlage für die orale Immunisierung von Kindern mit Pertussis-Antigen zu schaffen.

Nur durch umfangreiche Feldversuche ließe sich klären, ob sie orale Immunisierung gegen Pertussis auch beim Menschen möglich ist.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Anhand von Mäuseschutzversuchen wurde die Möglichkeit einer oralen Immunisierung mit Pertussisvakzine untersucht.

Die Versuche beweisen, daß die orale Immunisierung von Mäusen gegen eine letale Dosis virulenter Pertussisbakterien grundsätzlich möglich ist. Die Wirksamkeit einer oralen Immunisierung hängt ab von folgenden Gegebenheiten:

1. Für die oral-enteralen Immunisierungen wurden mindestens die 100-fachen Antigenmengen der par-enteralen Immunisierung verwendet; dennoch ließ sich selbst bei optimalen Antigendosen kein 100 %-iger Schutz der Tiere erzielen.
2. Durch eine Erhöhung der Impfdosis von 27×10^9 auf 350×10^9 PO ließ sich der Immunitätserfolg von 20 auf 90 % bei Verabreichung der Vakzine über die Sonde erreichen. Eine Erhöhung der Antigenmenge bis zu 750×10^9 PO führte zu keiner weiteren Steigerung der Wirksamkeit.
3. Der Impferfolg hing in großem Ausmaß von der Art der oral-enteralen Applikation der Vakzine ab. Hierbei erwies sich die lokale Immunisierung über den Magen-Darmtrakt mit Hilfe einer Sonde der

Immunisierung direkt in die Mundhöhle überlegen.

4. Unterschiedliche Impfrhythmen beeinflussten den
Impferfolg stark.

Trotz der sehr hohen Ag-Dosen, bis zu 750×10^9 PO, waren bei den Versuchstieren nach der oral-enteralen Immunisierung keine Unverträglichkeitszeichen zu erkennen.

Das Ausmaß der nach einer modifizierten Mancinitech-
nik gefundenen AgAk-Reaktion korrespondierte eng mit
den durch die Belastung der Tiere gefundenen Schutz-
werten.

SUMMARY

Based by mouse-protection-tests the possibility of an oral immunization with pertussis vaccine was tested. The experiments have proved, that an oral immunization of mice against a lethal dose of virulent bacteria is principally possible. Effectiveness of an oral immunization depends on the following facts:

1. The quantity of Ag's applied for the parenteral immunization, multiplied by a hundred at least, was used for the oral-enteral immunization; and yet it was impossible to protect a hundred per cent of the animals, even by applying optimal doses of Ag.
2. By increasing the dose from 27×10^9 to 350×10^9 PO the degree of immunization rose from 20 to 90 % if vaccine was given by sound. A further increase of the quantity of Ag up to 750×10^9 didn't cause any increase of effectiveness.
3. The success of vaccination depended to a great extent on the kind of oral-parenteral immunization. The local immunization of the stomach turned out to be more successful than the oral immunization.
4. By varying the intervals of vaccination the results obtained differed widely in success.

Despite the high Ag-doses up to 750×10^9 PO the animals tested did not show any signs of incompatibility after the oral-enteral immunization. The extent of the AgAk-reaction found in a modified Mancinitechnic corresponded with the data of the infection test.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Aftandelian, R., Immunologic studies of pertussis -
and J.D.Connor development of precipitins
J.of Pediatrics 83, 206 (1973)
2. Andersen, E.K. Active pertussis immunity in mice
after recovery from pulmonary in-
fection or vaccination against
H.pertussis
Acta Path.Microbiol.Scan. 32, 125
(1953)
3. Anderson, I.M., Encephalopathy after combined diph-
and D.Morris theria-pertussis inoculation
The Lancet 1, 537 (1950)
4. Baines, J.H. Immunization against whooping-cough
Brit.Med.J. 5461, 592 (1965)
5. Baird, H.W., Infantile myoclonic seizures
and L.G.Borofsky J.of Pediatrics 50, 332 (1957)
6. Baljer, G., Experimentelle Untersuchungen zur
H.Starflinger, oralen Immunisierung mit Tetanus-
K.H.Sorg, Toxoid
J.Sauer und Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 232,
A.Mayr 488 (1975)
7. Bazin, H., Réponses immunologiques induites
C.André et par voie orale
J.F.Heremans Ann.Immunol. 124 C, 253 (1973)

8. Berenbaum, M.C., J. Ungar and W.K. Stevens Intracranial infection of mice with bordetella pertussis
J.Gen.Microbiol. 22, 313 (1960)
9. Bordt, D.E., J.W. Whalen and P.A. Bayer Poliomyelitis component in quadruple antigen
J.Amer.Med.Ass. 174, 1166 (1960)
10. Byers, R.K., and F.C. Moll Encephalopathies following prophylactic pertussis vaccine
Pediatrics 1, 437 (1948)
11. Chao, D.H.-C., F.M. Taylor and R. Druckman Massive spasms
J.of Pediatrics 50, 670 (1957)
12. Christensen, C.N. More risk to give, or not to give?
A.J.Dis.Child. 105, 417 (1963)
13. Cohen, H., and Ch. A. Hannik Pertussis-Impfung
Gelbe Hefte d. Behringwerke 97 (1973)
14. Cooper, G.N. Aktive immunity in mice following the intranasal injection of sub-lethal doses of living H.pertussis
J.Path.and Bakteriologie. 64, 65 (1952)
15. Di Sant'Agnese, P.A. Combined immunization against diphtheria, tetanus, and pertussis in children over three months of age; including an evaluation of the effectiveness of two immunizing agents
J.of Pediatrics 31, 251 (1947)

16. Di Sant'Agnese, P.A. Simultaneous immunization of new-born infants against diphtheria, tetanus and pertussis
A.J.Pub.Health 40, 674 (1950)
17. De Gara, P.F. The agglutinative reaction for H.pertussis following whooping cough and following immunization
J.of Pediatrics 171 (1947)
18. Dolby, J.M. The separation of the histamine-sensitizing factor from protective antigens of B.pertussis
Immunol. 1, 328 (1958)
19. Donald, A.B. The diagnosis of whooping-cough
Brit.Med.J. 613 (1938)
20. Eldering, G. A study of the antigenic properties of H.pertussis and related organisms
II. protection tests in mice
Amer.J.Hyg. 36, 294 (1942)
21. Evans, D.G., and F.T.Perkins The ability of pertussis vaccine to produce in mice specific immunity of a type not associated with antibody production
Brit.M.J. 35, 322 (1954)
22. Evans, D.G., and F.T.Perkins Tests for agglutinin production by pertussis protective antigen, SPA
J.Path.Bact. 69, 329 (1955)

23. Finger, H. Possible mechanism of adjuvant action
Int. Arch. All. 36, 293 (1969)
24. Finger, H., Einfluß von Bordetella pertussis auf
P. Emmerling und das lymphatische Gewebe von Mäusen
G. Beneke II. Proliferierende Zellsysteme in
 der Milz nach Injektion von
 Bordetella pertussis
Z. Med. Mikrobiol. u. Immunol. 154, 178
(1968)
25. Finger, H., Bordetella pertussis als immunolo-
und P. Emmerling gisches Adjuvans
 Dtsch. Med. Wschr. 2, 89 (1970)
26. Finger, H., Variable adjuvant activity of B.
P. Emmerling und pertussis with respect to primary
E. Brüss and secondary immunization of mice
 Inf. and Imm. 1, 251 (1970)
27. Finger, H. Einfluß von B. pertussis auf das
P. H. Stein, lymphatische Gewebe von Mäusen
G. Beneke, VII. Untersuchungen über die Be-
P. Emmerling und ziehungen zwischen den durch
L. Plage B. pertussis ausgelösten
 biologischen Effekten
28. Fleming, D. S., The use of combined antigens in
and L. Greenberg the immunization of infants
 Canad. Med. Ass. J. 62, 146 (1950)
29. Freudenstein, H. Die Wirksamkeitsprüfung von Per-
 tussis-Impfstoffen an der weißen
 Maus
 Z. Kontroll. Lab.-Blatt d. Behring AG
 143 (1962)

30. Gittermann, L.A., M.O.Podgajsskaja und L.J.Rajcher Oral immunization with pertussis vaccine in experiments on animals Zhurnal Mikrobiol.Epidemiol.i. Immunol. 10, 10 (1970)
31. Govern, J.P. Passive intraperitoneal mouse protection test in a study of immune response to H.pertussis vaccination Pediatrics 5, 38 (1950)
32. Hallmann, L. "Beschreibung von B.pertussis" in: Bakteriologie und Serologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1950), S.162
33. Hallmann, L., und F.Burkhardt "Konservierung mittels Gefriergetrocknung" in: Klinische Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974), 4.Auflage, S.608
34. Hallmann, L., und F.Burkhardt "Mc Farland-Skala" in: Klinische Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974), 4.Auflage, S.648
35. Halpern, S.R., and D.Halpern Reactions from DPT immunization and its relationship to allergic children J.of Pediatrics 47, 60 (1955)
36. Hansen, F. Aktive Immunisierung im Kindesalter Dtsch.Med.Wschr. 11, 432 u. 468 (1954)

37. Hansen, F. Nutzen und Schaden der Pertussis-
Impfung
Gelbe Hefte 6, 189 (1964)
38. Hansen, F. "Die Keuchhustenschutzimpfung"
in: H. Spiess Schutzimpfungen,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
(1958), S. 63 ff.
39. Holt, L. B. Quantitative studies in diphtheria
prophylaxis
Brit. J. Exp. Path. 31, 233 (1950 b)
40. Hayek, H. W. Problematik der aktiven Keuchhusten-
schutzimpfung in Österreich
W. Med. Wschr. 44, 937 (1968)
41. Hille, H. Der Einfluß einer therapeutischen
Vakzination auf die Entstehung von
Keuchhustenkomplikationen
M. Med. Wschr. 100, 873 (1958)
42. Hof, H.,
 und H. Finger Zur Entstehung der generellen Immuni-
tät nach oraler Aufnahme von abge-
töteten Pertussisbakterien
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 227,
282 (1974)
43. Hof, H.,
 H. Finger,
 L. Körner und
 L. Milcke Studies on the immunizing capacity
of orally administered particulate
antigens
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 230,
210 (1975)

44. Holt, L.B.,
V. Spasojevic,
J.M. Dolby and
F.B. Standfast Immunity in mice to an intra-
cerebral challenge of bordetella
pertussis
J.Hyg. 59, 373 (1961)
45. Jawetz, E.,
J.L. Melnick und
E.A. Adelberg "Bakterien der Hemophilusgruppe"
in: Medizinische Mikrobiologie
Springer Verlag Berlin, Heidel-
berg, New York (1973), S. 318
46. Kendrick, F.I. zit. nach Herrlich, A., Handbuch der
Schutzimpfungen, Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York 1965
47. Kendrick, F.I.,
G. Elderling,
M.K. Dixon and
J. Misner Mouse protection tests in the study
of pertussis vaccine: a comparative
series using the intracerebral
route for challenge
A.J. Publ. Health 37, 803 (1947)
48. Kolle, W.,
R. Kraus und
P. Uhlenhuth "Keuchhustenbacillus Bordet-Gengou"
in: Handbuch der pathogenen Mikro-
organismen Bd. V, Gustav Fischer
Verlag, Jena (1928) 1346
49. König, E. Zur Pertussisimpfung und ihren
Gegenindikationen
Helv. Paed. Acta 8, 90 (1953)
50. Köttgen, U. Betrachtungen zur Behandlung des
Keuchhustens
Gelbe Hefte 185 (1964)
51. Lapin, J.H.,
and N.Y. Bronx The stimulating dose in whooping
cough
J. of Pediatrics 20, 18 (1942)

70. Pittmann, M. Discussion à Cockburn 1958
Rev. Immunol. 22, 432 (1958)
71. Powell, H.M., A rapid pertussis agglutination
and W.A. Jamieson test
J. Immunol. 43, 13 (1942)
72. Raettig, A.J. Die orale Impfung mit inaktivierten
Mikroorganismen
Bundesgesundheitsblatt 11, 141 (1971)
73. Reed, L.J., A simple method of estimating fifty
and H. Muench per cent endpoints
A.J. Hyg. 27, 493 (1938)
74. Sako, W. Studies on pertussis immunization
J. of Pediatrics 30, 29 (1947)
75. Sauer, L.W. Immunization with bacillus per-
tussis vaccine
J. Amer. Med. Ass. 101, 1449 (1933)
76. Sauer, L.W. The preparation of bacillus per-
tussis vaccine for immunization
J. Amer. Med. Ass. 102, 1471 (1934)
77. Sauer, L.W. The known and the unknown of bacil-
lus pertussis vaccine
Amer. J. Publ. Hlth. 25, 1226 (1935)
78. Simon, C., Zur Ampicillin-Therapie des Keuch-
M. Bontemps, hustens
K. Wiese und Dtsch. Med. Wsch. 94, 2435 (1969)
R. Schewior-Roland

79. Starflinger, H. Experimentelle Untersuchungen zur oralen Immunisierung mit Tetanus-Toxoid
vet.-med. Dissertation, München 1974
80. Ström, J. Further experience of reactions, especially of a cerebral nature, in conjunction with triple vaccination: A study based on vaccination in Sweden 1959-65
Brit.Med.J. 4, 320 (1967)
81. Sutherland, J.W. "The separation and purification of bacterial antigens" in: Handbook of Experimental Immunology, 2.1. (1973)
82. Toomes, J.A. Reactions to pertussis vaccine
J.A.M.A. 139, 448 (1949)
83. Vahlquist, B.,
U.Murray and
N.G.Persson Studies on diphtheria:
II. immunization against diphtheria
in newborn babies and infants
Acta Ped.Uppsala 41, 53 (1952)
84. Vahlquist, B.,
and P.Nordbring Studies on diphtheria:
VI. the effect of diphtheria
immunization on newborn pre-
matures
Acta Ped.Uppsala 41, 53 (1952)
85. Wardlaw, A.C.,
and C.M.Jakus Intracerebral mouse protection test
for pertussis vaccine
I. Apparent absence of humoral protective antibody under usual
test conditions
Can.J.Mikrobiol. 14, 989 (1968)

86. Werne, J., Fatal anaphylactic shock
 and J. Garrow J.A.M.A. 131, 730 (1946)
87. Werner, E, Therapie des Keuchhustens
 Gelbe Hefte 3, 105 (1973)
88. WHO Diphtheria and pertussis vaccina-
 tion, report of a conference of
 heads of laboratories producing
 diphtheria and pertussis vaccines
 Wld.Hlth.Org.Techn.Rep.Ser.No.61
 Genf, May 1953
89. Zakharova, M.S., Reactogenicity of associated vaccines
 and M.A. Dadas- Vestn.Akad.Med.Nauk. 15, 35 (1960)
 hyaw

Herrn Prof. Dr.Dr.h.c. A. Mayr möchte
ich für die Überlassung des Themas,
Herrn Prof. Dr. H. Stickl für die
Überlassung des Arbeitsplatzes und für
wertvolle Hinweise danken.

Besonders herzlich danke ich Frau
Dr. van Thiel für die jederzeit gewährte
hilfreiche Unterstützung.

LEBENS LAUF

Am 26. Februar 1948 wurde ich als Tochter des Fischerei-Biologen Dr. Paul Laßleben und seiner Ehefrau Hermine, geb. Knauer, in Kallmünz geboren.

Nach vier Volksschuljahren in Landshut trat ich in das Gymnasium ein und bestand im Sommer 1967 am Gymnasium Seligenthal in Landshut die Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich an der tierärztlichen Fakultät der Universität München mit dem Studium der Veterinärmedizin. Dieses schloß ich im Herbst mit dem Staatsexamen ab.

Vom 1. April 1973 bis Oktober 1973 arbeitete ich als Assistentin in der tierärztlichen Praxis.

